

UPLC-MS/MS で VICAM イムノアフィニティークロマトグラフィークリーンアップを用いた、さまざまな食品中のアフラトキシンおよびオクラトキシン A の測定

Nicola Dreolin, Sara Stead, Simon Hird

Waters Corporation

要約

アフラトキシンおよびオクラトキシン A は、収穫前および収穫後の汚染メカニズムを介してさまざまな食品中に自然に生成される可能性があり、世界中で規制されています。マイコトキシンで汚染された食品を摂取すると、人体に重大なリスクをもたらす可能性があります。ここでは、特定の食品分析用の以下の 3 種の分析法について説明します。

1. Aflatest WB クリーンアップを使用する、ピーナッツ、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ中のアフラトキシンの分析法
2. OchraTest WB クリーンアップを使用する、焙煎コーヒーおよびココア中のオクラトキシン A の分析法
3. AflaOchra クリーンアップを使用する、黒コショウ中のアフラトキシンおよびオクラトキシン A の分析法

上記の分析法はすべて、スパイクしたサンプルおよび自然汚染したレファレンス物質（入手できる場合）を使用して社内バリデーション済みです。これらの分析法は固液抽出に基づいており、これにイムノアフィニティークロマトグラフィー（IAC）および LC-MS/MS 分析を使用するトラップ&リリースのステップが後続します。

これらの分析法は、真度および再現性の点で最適な性能を実現し、分析法の LOQ は、アフラトキシンについて 0.050 μ g/kg、オクラトキシン A について 0.4 μ g/kg と低いです。

IAC クリーンアップを使用すると、溶媒標準試料に基づいた検量線を使用でき、厳密にマトリックスマッチドキャリブレーション標準試料を調製する必要がなくなり、（同位体標識付き）内部標準試料を使用する必要がないため、非常に便利です。さらに、非常に特異な抗体ベースの結合によって優れた回収率（71～108%の範囲で平均90%）が得られ、マトリックス効果の可能性が最小限に抑えられ、タンデム質量分析との組み合わせに適しています。

アプリケーションのメリット

- 複雑なマトリックス中のマイコトキシンにターゲットを絞った非常に選択性の高い分析法
- サンプル前処理のどの時点でも、同位体標識付き内部標準試料が不要
- マトリックスマッチドキャリブレーション標準試料が不要で、溶媒標準試料を使用して信頼性の高い定量が可能
- あらゆるマトリックスでアフラトキシンおよびオクラトキシン A について非常に低い分析法 LOQ を達成
- 分析法の再現性が際立って高い（黒コショウで AflaOchra により RSDr < 5%）
- マトリックス効果がほとんど見られない

はじめに

食品および飼料用の農作物中のアフラトキシンとオクラトキシン A の測定は、厳格な規制制限の遵守を確認するために、業界と管轄当局の双方にとって同様に優先事項です。汚染食品は人間の健康に害を及ぼすリスクがあるため、多くの国では、Codex 基準¹に加えて独自のマイコトキシン法規制があります。欧州連合（EU）は、一部の規制対象物質について世界で最も厳しい最大許容限界を使用しており、また、食物連鎖中の汚染物質に関する新たなリスクについて EFSA 委員会からの勧告を受けています^{2,3}。抗体に基づくイムノアフィニティークロマトグラフィー（IAC）の使用は、マイコトキシン分析の人気のあるアプローチになっています。イムノアフィニティークラムは、抗体が共有結合で固定化されたポリマーゲル相があらかじめ充填されており、特定のターゲット化合物に対する交差反応が特徴です。抽出物をカラムに通すと、ターゲットのマイコトキシンが選択的に抗体に結合し、他の共抽出成分は洗浄ステップで除去されます⁴。次に、抗体を変性させるメタノールなどの混和性溶媒で、マイコトキシンを溶出します。イムノアフィニティークラムは特異性が高いため、選択性がより低い SPE 吸着剤より清浄な抽出物が得られ、共抽出物による干渉の影響を受けにくくなります。IAC を用いたクリーンアップと蛍光検出を備えた HPLC 分析の組み合わせが、アフラトキシンの規制限界への準拠を確認するためのコスト効率の高い方法として、長年にわたって使用されてきました^{5,6}。一方、IAC カラムを LC-MS/MS と併用することで、たとえば乳児や小児向けの食品などで規制濃度限界が非常に低い場合など、より複雑な食料品の分析に対応するために、感度を高めることができます。また、マトリックスマッチドキャリブレーションや内部標準試料に頼ることを避けて、定量が簡素化されます⁷。本研究では、各種ナッツ中のアフラトキシン、コーヒーおよびココア中のオクラトキシン A、黒コショウ中のアフラトキシンとオクラトキシン A を測定するための

3種の分析法の性能を実証します。

実験方法

分析法 1 – Aflatest WB クリーンアップを使用する、ピーナッツ、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ中のアフラトキシンの分析

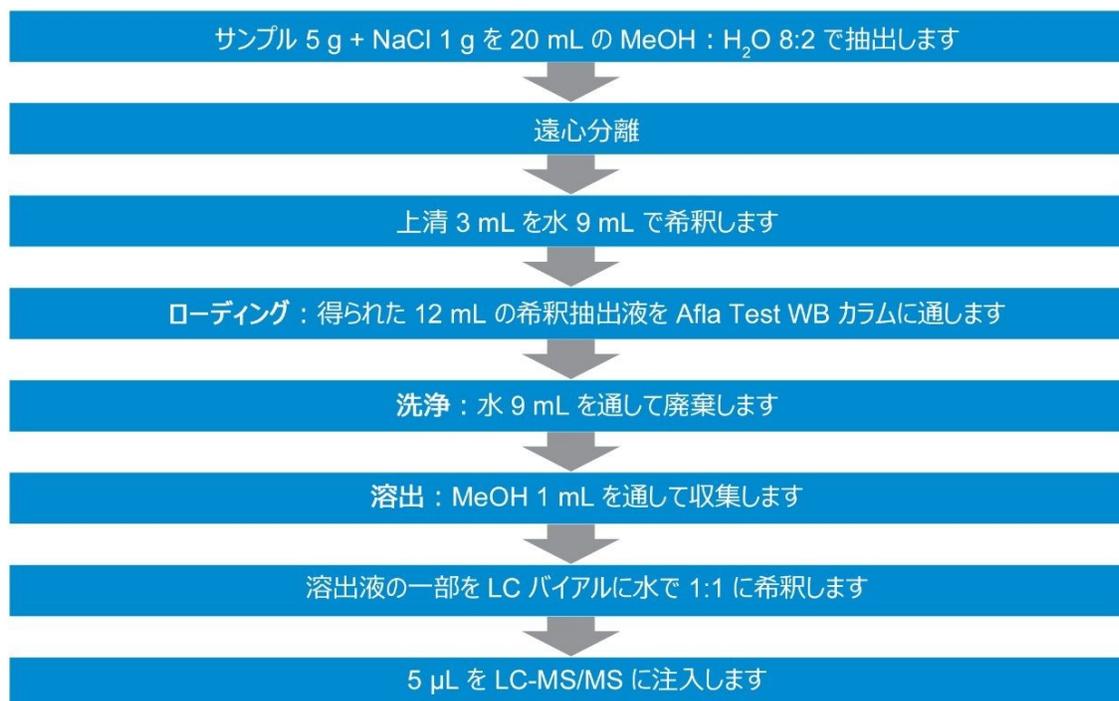


図 1. サンプル前処理プロトコルのスキーム

サンプルの説明および前処理

ピーナッツおよびピスタチオは地元の市場で購入しました。各食料品約 300 g を粉砕し、分析ミル (IKA) を用いて均質化してから抽出しました。ヘーゼルナッツのレファレンス物質は、Fera Science Ltd (FAPAS T04390QC <<https://fapas.com/shop/product/aflatoxins-in-hazelnut-quality-control-material/2032>>) から、均質化した水/ナッツスラリーの形で入手しました。FAPAS QC 物質中のアフラトキシンの濃度の割り当て値および範囲は、付録 A に記載されています。

サンプルの抽出およびクリーンアップ

均質化した固体サンプル 5.0 ± 0.01 g および塩化ナトリウム 1 g を 50 mL のファルコンチューブに入れて、抽出を行います。チューブに 20 mL の MeOH: H₂O 8:2 (v/v) を加えて 10 秒間激しく振とうし、自動ボルテックスミキサーに 10 分間かけます。5,000 rpm (約 5,300 g) で 6 分間遠心分離した後、上清 3 mL を 9 mL の水で希釈します。12 mL の希釈した抽出液を、1 滴/秒の流速で VICAM AflaTest WB カラム (製品番号 G1024) に通します (ローディングステップ)。次に 9 mL の水を、1 ~ 2 滴/秒の流速でカラムに通し (洗浄ステップ)、約 3 mL の空気をポンプで送り込みます。1 mL の MeOH を 1 滴/秒以下の流速でカラムに通して、アフラトキシンを溶出します。最後に、500 μL の溶離液を LC バイアル内で 500 μL の水と混合してから、LC-MS/MS 分析を行います。最終の希釈係数は 2.67 (8/3) です。

分析法バリデーション

回収実験は、ピーナッツおよびピスタチオのサンプルに 4 つの濃度レベル (各分析種について 0.05、0.5、1.5、10 μg/kg) のアフラトキシン混合物をスパイクして実行し、3 回繰り返しました。次に、前のセクションで説明したように、ブランク試料およびスパイクしたサンプルを抽出して、分析しました。ヘーゼルナッツのレファレンス物質の独立した 6 回の繰り返し分析により、真度と精度も確認しました。

分析法 2 - OchraTest WB クリーンアップを使用する、焙煎コーヒーおよびココア中のオクラトキシン A の分析

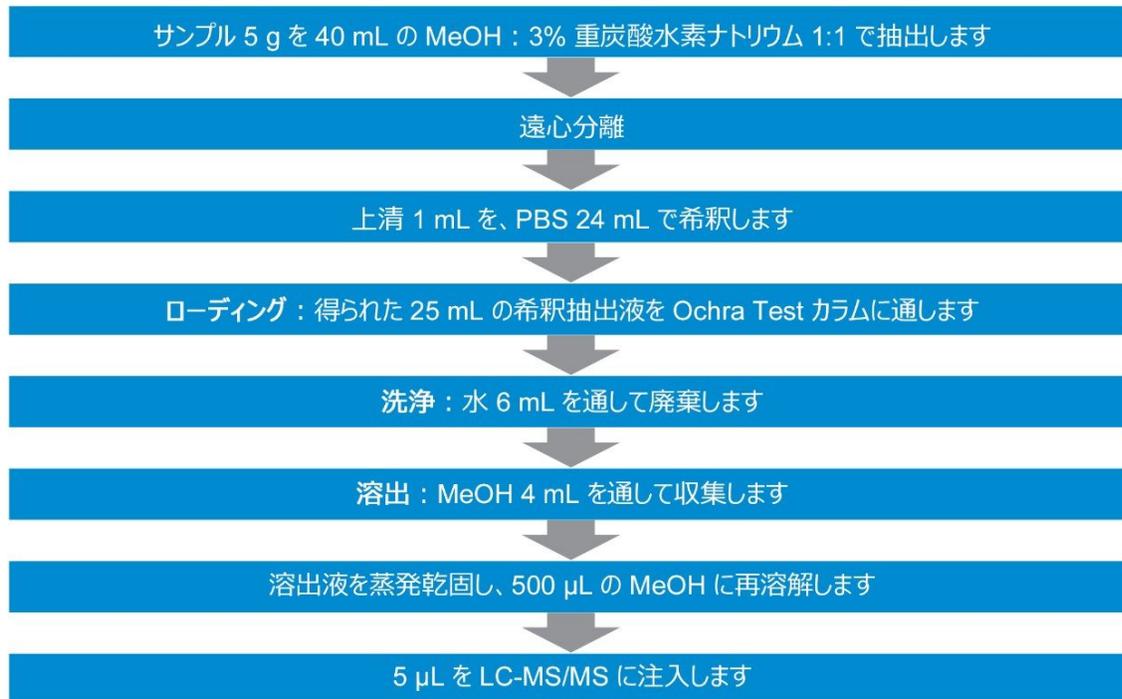


図 2. サンプル前処理プロトコルのスキーム

サンプルの説明および前処理

焙煎したコーヒー豆およびココアパウダーは地元の市場で購入しました。約 300 g のコーヒー豆を粉碎し、分析ミル（IKA）を使用して均質化してから抽出を行いました。ココア粉のバルクサンプルは、異なるサンプルの一部ずつを混合して調製しました。コーヒーおよびココアは、分析法バリデーションを行う前に LC-MS/MS を用いてスクリーニングし、検出可能なレベルの OTA は認められませんでした。

サンプルの抽出およびクリーンアップ

均質化したサンプル 5.0 ± 0.01 g を 50 mL のプラスチック遠心分離チューブに量り取ります。3% (w/v) 重炭酸ナトリウムa が含まれている 50:50 (v/v) の MeOH: H₂O 混合液で構成される抽出溶液を 40 mL 追加します。チューブを自動ボルテックスに 10 分間かけます。5,000 rpm（約 5,300 g）で 10 分間遠心分離した後、30 mL のガラスバイアルまたは同等品中で、抽出液の上清 1 mL を 24 mL のリン酸バッファー溶液（PBS）b と混合して 1:25 に希釈します。希釈した抽出液（25 mL）を、1～2 滴/秒の流速で VICAM OchraTest WB カラム（製品番号 G1033）に通します（ローディングステップ）。次に、6 mL の水を同じ流速（洗浄ステップ）でカラムに通してから、空気をポンプで送り込

みます（約 3 mL）。4 mL のメタノールをカラムに 1 滴/秒以下の流速で通し、オクラトキシン A を溶出して収集します。溶出液を、40 °C 窒素下で蒸発乾固します。残渣を 500 μ L の MeOH: H₂O 50:50 (v/v) に再溶解し、LC バイアルに移してから、LC-MS/MS 分析を行います。最終の希釈係数は 4 です。

(a) 抽出溶液の調製：1 L のガラスボトルに 15 g の重炭酸ナトリウムと 500 mL の精製水を加えます。十分混合し、ボトルを超音波洗浄機にかけ、塩を完全に溶解させます。500 mL のメタノールを加え、十分混合します。

(b) PBS の調製：1 L のガラスボトルに 100 mL の VICAM 10 倍濃縮 PBS（製品番号 G1113）と 900 mL の精製水（pH 7.0）を加えます。

分析法バリデーション

粉末コーヒーおよびココアのサンプルに 3 濃度（0.40、2.0、6.0 μ g/kg）のオクラトキシン A をスパイクした 3 回の繰り返し回収実験により、真度を確認しました。次に、前のセクションで説明したように、ブランク試料および添加したサンプルを抽出して分析しました。6 つのコーヒーおよびココアのブランクサンプルに 6.0 μ g/kg の OTA を添加し、日内再現性パラメーターとして RSDr% を算出しました。

分析法 3 - AflaOchra クリーンアップを使用する、黒コショウ中のアフラトキシンおよびオクラトキシン A の分析



図 3. サンプル前処理プロトコルのスキーム

サンプルの説明および前処理

黒コショウの実は地元の市場で購入しました。約 200 g のサンプルを粉碎し、分析ミル (IKA) を使用して均質化してから抽出を行いました。粉末黒コショウレファレンス物質は Fera Science Ltd. ([FAPAS T04332QC <https://fapas.com/shop/product/mycotoxins-in-black-pepper-quality-controlmaterial/1234>](https://fapas.com/shop/product/mycotoxins-in-black-pepper-quality-controlmaterial/1234)) から入手しました。FAPAS QC 物質中のアフラトキシンおよびオクラトキシン A の濃度の割り当て値および範囲は、付録 A に記載されています。

サンプルの抽出およびクリーンアップ

均質化した固体サンプル 5.0 ± 0.01 g を 50 mL のファルコンチューブに入れて、抽出を行います。10 mL の MeCN: H₂O 84:16 (v/v) を加え、チューブを 3 分間ボルテックス混合します。15 mL の MeOH: H₂O 80:20 (v/v) を加え、チューブをさらに 3 分間ボルテックス混合します。5,000 rpm (約 5,300 g) で 6 分間遠心分離した後、上清 2.5 mL を 47.5 mL の 2% (w/w) Tween-20 リン酸バッファー溶液 (PBS)^a で希釈します。希釈した抽出液 (50 mL) 全体を、1 滴/秒の流速で VICAM AflaOchra カラム (製品番号 G1017) に通します (ローディングステップ)。

次に、10 mL の PBS^b を 1～2 滴/秒の流量でカラムに通し（洗浄ステップ 1）、さらに 10 mL の水を通します（洗浄ステップ 2）。約 3 mL の空気をゆっくりポンプで送り込んでカートリッジを乾かします。0.7 mL の MeOH を 1 滴/秒で通し、収集します（溶出 1）。カラムは、余分な空気をポンプで送らずに乾かし、1 分間放置します。さらに 0.7 mL の MeOH を通し（溶出 2）、10 mL の空気を強制的に通して前の部分とともに収集します。最後に、300 μ L の溶離抽出液を 200 μ L の水と混合して、直接 LC バイアルに入れてから LC-MS/MS 分析を行います。最終の希釈係数は 4.67 (14/3) です。

(a) 希釈剤（2% Tween-20 含有 PBS）の調製：20 g の Tween-20 を 1 L のガラスボトルに量り取ります。100 mL の VICAM 10 倍濃縮 PBS（製品番号 G1113）と 900 mL の精製水を加えます。十分混合し、10 分間超音波洗浄機にかけます。

(b) PBS の調製：1 L のガラスボトルに 100 mL の VICAM の 10 倍濃縮 PBS（製品番号 G1113）と 900 mL の精製水（pH 7.0）を加えます。

分析法バリデーション

回収実験では、分離した黒コショウサンプルに 4 濃度レベルのアフラトキシンと OTA の混合物（各アフラトキシンは 0.1、0.5、1.5、10 μ g/kg、および OTA は 0.4、2.0、6.0、40 μ g/kg）をスパイクし、3 回繰り返しました。次に、前のセクションで説明したように、ブランク試料および添加したサンプルを抽出して分析しました。黒コショウの認証済みレファレンス物質の独立した 6 回の繰り返し分析により、真度と精度も確認しました。

結果および考察

分析法 1

直線性、検出限界、定量

分析法の直線性は、試験した濃度範囲（0.050～13.3 μ g/kg）にわたって確認されました。標準溶液は溶媒中で調製しました（標準試料の調製については付録 A を参照）。表 1 に、直線性パラメーター、検出下限値（LOD）、定量下限値（LOQ）が示されています。各アフラトキシンについて、装置の LOQ は 0.013 ng/mL、分析法の LOQ は 0.050 μ g/kg でした。ピーナッツ、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ中の AFB₁ の EU での最大限界値は、それぞれ 2.0、5.0、8.0 μ g/kg です。一方、AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂ の合計の最大限界値は、ピーナッツでは 4.0 μ g/kg、ピスタチオとヘーゼルナッツでは 10.0 μ g/kg です²。これらの限界は、分析法の直線性の範囲内です。

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
直線範囲	0.050~15 µg/kg			
装置の LOD/LOQ	0.004/0.013 ng/mL			
分析法の LOD/LOQ	0.015/0.050 µg/kg			
傾き [面積*kg/µg]	756	603	709	373
切片 [面積]	31	6	11	-1
決定係数 (R ²)	0.9998	1	0.9999	0.9999
最大残差 (%)	5	8	7	10

表 1. ピーナッツおよび木の实（ピスタチオ、ヘーゼルナッツ）に含まれるアフラトキシンの直線性パラメーターおよび定量パラメーター

真度および精度

すべてのレベルにわたって、ピーナッツでの回収率は 82 ~ 106%、ピスタチオでの回収率は 77% ~ 100% でした（表 2）。ヘーゼルナッツのレファレンス物質での計算濃度は $\pm 2|z|$ -スコアの範囲内で、真度は 83 ~ 99% でした。再現性条件 (RSDr%) で精度を評価したところ、表 3 に示されているように、1.5 ~ 3.6% の範囲でした (n=6)。分析法性能について、EU 規則で設定されているアフラトキシンの推奨回収率は、1.0 µg/kg 未満の濃度では 50 ~ 120%、1 ~ 10 µg/kg の範囲の濃度では 70 ~ 110% であり、最大 RSDr% は 14.5% に設定されています (Horwitz の式から算出)⁸⁻¹⁰。したがって、分析法の真度と再現性は欧州規則に合致しています。

スパイク μg/kg	マトリックス	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
0.05	ピーナッツ	100 ± 2	101 ± 2	98 ± 4	106 ± 2
	ピスタチオ	84 ± 3	77 ± 4	94 ± 2	79 ± 4
0.5	ピーナッツ	98 ± 3	97 ± 1	96 ± 1	97 ± 5
	ピスタチオ	82 ± 2	91 ± 5	85 ± 4	85 ± 4
1.5	ピーナッツ	94 ± 6	100 ± 3	100 ± 5	95 ± 2
	ピスタチオ	97 ± 2	99 ± 2	98 ± 2	98 ± 2
10	ピーナッツ	86 ± 2	86 ± 3	86 ± 1	82 ± 5
	ピスタチオ	97 ± 1	100 ± 1	96 ± 2	99 ± 3

表 2. 4 濃度レベル±標準偏差でスパイクした食品マトリックスでの回収率 (%) (n = 3)

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
平均 (μg/kg)	4.38	2.24	1.81	0.9
標準偏差 (μg/kg)	0.07	0.05	0.04	0.03
RSD%	1.5	2.2	2.2	3.6
Xa (μg/kg)	4.5	2.27	1.96	1.09
Xa-2 z (μg/kg)	2.52	1.27	1.1	0.61
Xa+2 z (μg/kg)	6.49	3.26	2.83	1.57
真度 (%)	97	99	92	83

表 3. 濃度既知のアフラトキシンが含まれている FAPAS ヘーゼルナッツ試験物質 (T04390QC) の分析結果 (FAPAS ヘーゼルナッツレファレンス物質の計算濃度の平均値、標準偏差、相対標準偏差 (%))。Xa = 割り当て値)

分析法 2

直線性、検出限界、定量

分析法の直線性が、試験した濃度範囲 (固体サンプルで 0.40 ~ 80 μg/kg) にわたって確認されました。標準溶液は溶媒中で調製しました (標準試料の調製については付録 A を参照)。表 4 に、直線性パラメーター、検出下限値 (

LOD)、定量下限値 (LOQ) が示されています。装置の LOQ は 0.10 ng/mL、分析法の LOQ は 0.40 µg/kg でした。焙煎コーヒー豆および挽いた焙煎コーヒーの中の OTA の EU での最大限界は 5.0 µg/kg で²、キャリブレーション範囲内に十分収まっています。ココア粉末は現在、EFSA 食品汚染物質委員会によってレビュー中であり、今後規制される予定です。コーヒーと同様に最大限界値が設定される可能性が高いと考えられます。

直線範囲	0.40~80 µg/kg
装置の LOD/LOQ	0.030/0.10 ng/mL
分析法の LOD/LOQ	0.12/0.40 µg/kg
傾き [面積*kg/µg]	241
切片 [面積]	25
決定係数 (R ²)	0.9996
最大残差 (%)	8

表 4. コーヒーおよびココア中のオクラトキシン A に対する直線性および定量パラメーター

真度および精度

コーヒーでの回収率は 90 ~ 98%、ココアでの回収率は 86 ~ 90% でした (表 5)。精度は再現性条件で評価しました。再現性実験 (独立した 6 回の繰り返し分析) の結果、コーヒーおよびココアでの RSDr% はそれぞれ 1.0 % および 2.1% です。分析法性能について、EU 規則で設定されているオクラトキシン A の推奨回収率は、1 µg/kg 未満の濃度で 50 ~ 120%、1 µg/kg を超える濃度で 70 ~ 110% であり、最大 RSDr% は、1 µg/kg 未満の濃度では 40%、1 µg/kg を超える濃度では 20% に設定されています⁸。したがって、分析法の真度および再現性は欧州規制に合致しています。

スパイク $\mu\text{g}/\text{kg}$	コーヒー	ココア
0.4	98 \pm 4	90 \pm 5
2	95 \pm 2	86 \pm 3
6	90 \pm 2	87 \pm 2

表 5. 異なるスパイクレベルでのコーヒーおよびココア中のオクラトキシン A の回収率 (%) ($n = 3$)

分析法 3

直線性、検出限界、定量

この分析法の直線性は、試験した濃度範囲にわたって検証されました（アフラトキシンでは 0.10 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、オクラトキシン A では 0.40 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）。標準溶液は溶媒中に調製しました（標準試料の調製については付録 A を参照）。表 6 に、直線性パラメーター、検出下限値 (LOD)、定量下限値 (LOQ) が示されています。装置の LOQ は、各アフラトキシンについて 0.02 ng/mL、オクラトキシン A について 0.08 ng/mL で、分析法の LOQ は各アフラトキシンについて 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、OTA について 0.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でした。香辛料（黒コショウを含む）での AFB₁ および OTA の EU 最大許容限界は、それぞれ 5.0 および 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ です。一方、AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂ の合計の最大限界値は 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ です²。これらの限界は、分析法の直線性の範囲内です。

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	OTA
直線範囲	0.10~25 $\mu\text{g}/\text{kg}$				0.40~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
装置の LOD/LOQ	0.006/0.02 ng/mL				0.024~0.08 ng/mL
分析法の LOD/LOQ	0.030/0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$				0.12~0.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$
傾き [面積*kg/ μg]	585	529	691	363	139
切片 [面積]	2	-4	0	-6	-28
決定係数 (R ²)	0.9996	0.9998	0.9997	0.9999	0.9997
最大残差 (%)	8	5	7	2	8

表 6. 黒コショウ中のアフラトキシンおよびオクラトキシン A の直線性パラメーターおよび定量パラメーター

真度および精度

すべてのレベルにわたって、回収率は、各アフラトキシンについて 80～108%、OTA について 71～85% でした（表 7）。黒コショウのレファレンス物質の計算濃度は $\pm 2|z|$ スコアの範囲内で、各アフラトキシンについて真度は 73～102%、OTA について 70% でした。精度は再現性条件で評価され、表 8 に示されているように、RSDr% は各マイコトキシンについて 0.5～5% の範囲でした（ $n=6$ ）。分析法性能について、EU 規則で設定されているアフラトキシンの推奨回収率は、1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満の濃度では 50～120%、1～10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲の濃度では 70～110% であり、最大 RSDr% は 14.5% に設定されています（Horwitz の式から算出）⁸⁻¹⁰。分析法性能について、EU 規則で設定されているオクラトキシン A の推奨回収率は、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満の濃度で 50～120%、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超える濃度で 70～110% であり、最大 RSDr% は、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満の濃度では 40%、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超える濃度では 20% に設定されています⁸。したがって、分析法の真度と再現性は欧州規則に合致しています。

スパイク $\mu\text{g}/\text{kg}$ (アフラトキシン)	スパイク $\mu\text{g}/\text{kg}$ (OTA)	回収率 (%)				
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	OTA
0.1	0.4	102 \pm 5	108 \pm 4	85 \pm 5	85 \pm 6	85 \pm 6
0.5	2	99 \pm 3	96 \pm 5	82 \pm 5	83 \pm 4	73 \pm 2
1.5	6	101 \pm 3	98 \pm 1	85 \pm 3	87 \pm 1	75 \pm 5
10	40	96 \pm 2	96 \pm 2	87 \pm 3	80 \pm 1	71 \pm 2

表 7. 4 濃度レベル±標準偏差でスパイクした黒コショウでの回収率 (%) ($n=3$)

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	OTA
平均 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	3.46	3.32	1.12	1.72	6.21
標準偏差 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.07	0.02	0.03	0.09	0.25
RSD%	2	0.5	3	5	4
Xa ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	3.4	3.44	1.52	2.34	8.87
Xa-2 z ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.91	1.93	0.85	1.31	4.97
Xa+2 z ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	4.9	4.96	2.19	3.36	12.78
真度 (%)	102	97	73	74	70

表 8. FAPAS 黒コショウレファレンス物質 T04332QC の計算濃度の平均値、標準偏差、相対標準偏差 (%)。Xa = 割り当て値。割り当て値からの計算濃度の真度 (%)。

マトリックス効果の評価

UPLC-MS/MS で VICAM イムノアフィニティークロマトグラフィークリーンアップを用いた、さまざまな食品中のアフラトキシンおよびオクラトキシン A の測定

マトリックス効果係数 (ME_F%) をパーセント比率として評価しました。

$$ME_F\% = \left(\frac{b_M}{b_S} - 1 \right) * 100$$

ここで、b_M および b_S は、それぞれマトリックスマッチド検量線および溶媒検量線の勾配です。マトリックスマッチド検量線は、溶媒標準試料の調製と同じ希釈手順に従って、マイコトキシンのストック溶液をブランクマトリックス抽出液で希釈して調製した標準試料のレスポンスをプロットすることによって、取得しました。上記3種の分析法のうち、分析法1（ナッツ中のアフラトキシン）が最も低いマトリックス効果を示しました（マトリックス効果係数は -4% シグナル抑制から +2% シグナル増強までの範囲）。分析法3（黒コショウ中のアフラトキシンおよびオクラトキシン A）が最も高いマトリックス効果を示しました（マトリックス効果係数はアフラトキシンで +11 ~ +13% のシグナル増強、オクラトキシン A で -5% のシグナル抑制）。穀類中のオクラトキシン A の ME_F% > 100% のシグナル増強を示した既報の希釈シュート法と比較して、マトリックス効果が大幅に減少していることは特筆すべき点です¹¹。例えば、図4に黒コショウ中のアフラトキシン G₂ およびオクラトキシン A のキャリブレーションプロットが示されています。ここで見られるマトリックス効果は、試験した分析種の定量結果に有意な影響を及ぼしていないことが明らかです。イムノアフィニティークロマトグラフィーの使用によるマトリックス効果の低減は、非常に有益です。なぜなら、マトリックス効果を補償することや、マトリックスマッチドキャリブレーション試薬を調製することなく、分析法の回収率を測定できるため、溶媒標準試料を使用して正確な結果を得ることができるからです。

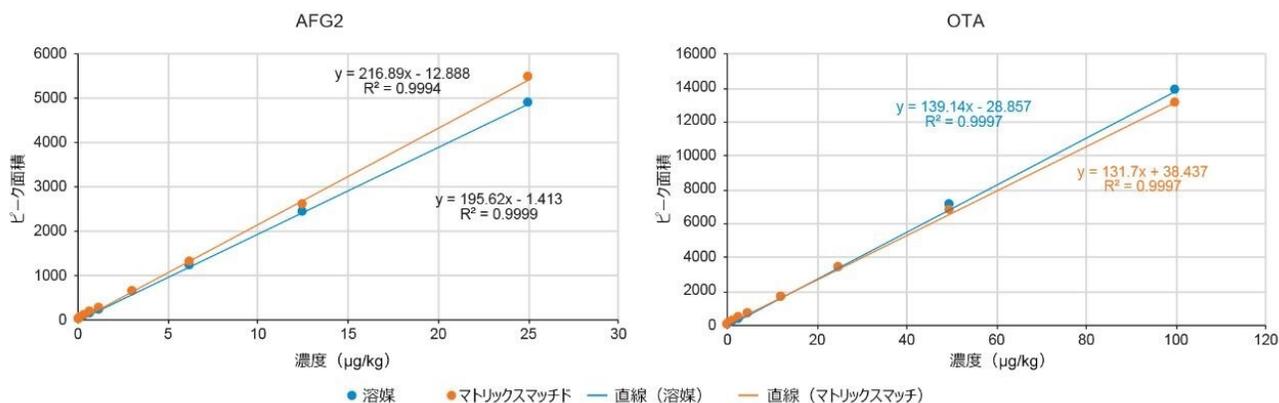


図4. アフラトキシン G₂ (分析法1) およびオクラトキシン A (分析法3) のキャリブレーションプロット。溶媒検量線とマトリックスマッチド検量線の曲線方程式が示されています。

図5に、溶媒ブランク試料およびピーナッツ抽出物の IAC クリーンアップした後の ESI+ SCAN クロマトグラムが示されています。アフラトキシンの溶出領域が強調表示されています。このクロマトグラムでは、分析に干渉することや、

エレクトロスプレーイオン化源領域で電荷を奪う追加の共抽出物が存在しないことが明らかです。これにより、イムノアフィニティークロマトグラフィーを使用する際に、マトリックス成分が効果的に除去されることの、さらなる証拠が得られます。

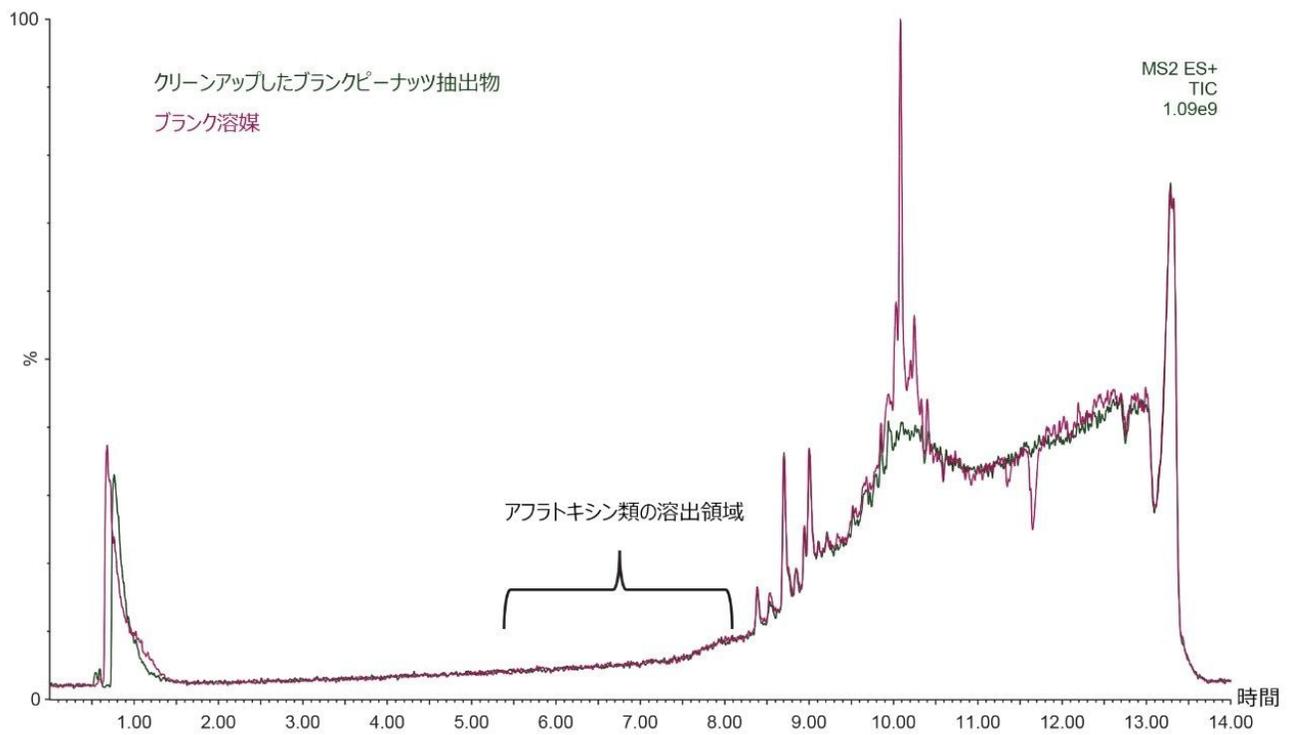


図 5. ES/MS で取り込んだクリーンアップしたピーナッツ抽出物（緑）およびブランク溶媒（赤）のクロマトグラムの重ね描き（スキャン時間：0.1 秒、取り込み： m/z 50 ~ 800）

結論

上記 3 つの分析法の性能は、欧州規則および SANTE ガイドラインで設定された基準を満たしています¹²。イムノアフィニティークロマトグラフィークリーンアップを使用する主な利点は、厳密にマトリックスマッチした標準試料を使用せずに溶媒中に調製したキャリブレーション標準試料を使用でき、信頼性の高い定量のための標識内部標準試料を使用しないことです。真のブランク試料を得るのは、一般的なホットスポット汚染が原因で困難であるため、このことは重要です。これらの分析法は、非常に高い再現性を示し、回収実験や濃度既知のマイコトキシンが含まれているレファレンス物質を使用して真度が検証されています。マトリックス効果も評価し、可能性のあるマトリックスによって誘起され

るシグナルの抑制や増強は非常に低く（|13|% 未満）、定量性能への影響はほとんどないことがわかりました。

最後に、これらの分析法は、この研究で試験した食品に類似したより広範な種類の食品に拡張できます。

謝辞

本研究に協力していただいた Nancy Zabe Collette、Danrey Toth、Chiara Bottesini に感謝致します。

参考文献

1. General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed (Codex STAN 193-1995).Codex Alimentarius, International Food Standards, FAO and WHO, last revision 2015.
2. European Commission Regulation No.1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs.Annex, section 2.
3. Contaminants in the Food Chain, EFSA Website (accessed 4th June 2021):
<https://www.efsa.europa.eu/en/science/scientific-committee-and-panels/contam> <
<https://www.efsa.europa.eu/en/science/scientific-committee-and-panels/contam>> .
4. Mycotoxins Analysis in Tree Nuts – Regulatory, Technology, and Economic Considerations.VICAM.2015. White Paper p/n 720005530EN (<https://www.vicam.com/white-papers/mycotoxin-analysis-tree-nuts> <
<https://www.vicam.com/white-papers/mycotoxin-analysis-tree-nuts>>).
5. Soleimany F., Jinap S., Rahmani A., Khatib A., Simultaneous Detection of 12 Mycotoxins in Cereals Using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and Post-Column Derivatization System.*Food Additives and Contaminants*, 2011, 28, p. 494–501.
6. Turcotte A-M., Scott P. M., Tague B., Analysis of Cocoa Products for Ochratoxin A and Aflatoxins.*Mycotoxin Res*, 2013, 29, p. 193–201.
7. Desmarchelier A., Sabine Tessiot S., Bessaire T., Racault L., Fiorese E., Urbani A., Chan W-C., Cheng P., Mottier P., Combining the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Approach and Clean-up by Immunoaffinity Column for the Analysis of 15 Mycotoxins by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.*Journal of Chromatography A*, 2014, 1337, p. 75–84.
8. European Commission Regulation No.401/2006 of February 23, 2006 Laying Down the Methods of Sampling

and Analysis for the Official Control of the Levels of Mycotoxins in Foodstuffs.

9. Horwitz W., Kamps L.R., Boyer K.W., Quality Assurance in the Analysis of Foods and Trace Constituents. *J.Assoc.Off.Analy.Chem.*,1980, 63, 1344–54.
10. Thompson M., Recent Trends in Inter-Laboratory Precision at ppb and Sub-ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing. *Analyst*, 2000, 125, p. 385–386.
11. Dreolin, N.; Stead, S. LC-MS/MS Method Development and Validation for the Quantitative Determination of Regulated Mycotoxins in Cereal Grain Flours Using Simplified Sample Preparation Conditions On Xevo TQ-XS. Waters Corporation. 2019. Application Note p/n 720006685en (<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135035321> < <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135035321>>).
12. SANTE/12089/2016. Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. Implemented by 01/01/2017.
13. AflaTest™ WB SR+ Performance Data for Spices, Cocoa, Coffee, and Herbs. VICAM Performance Data. 2021. (<https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus> < <https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus>>). Contact: techservice@vicam.com for more information.

付録 A

LC-MS/MS 条件

LC-MS/MS 条件は、以前に説明したマルチマイコトキシン分析法（アプリケーションノート 720006685en < <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-ms-ms-method-development-and-validation-for-the-quantitative-determination-of-regulated-mycotoxins-in-cereal-grain-flours-using-simplified-sample-preparation-conditions-on-xevo-tq-xs.html>> ）に基づいています¹¹。

液体クロマトグラフィー

システム:	ACQUITY UPLC I-Class (BSM) 、FTN オートサンプラーを搭載
カラム:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (2.1 × 100 mm、粒子径 1.7 μm、ポアサイズ 130 Å、製品番号 186002352)

水系移動相:	1 mM 酢酸アンモニウム水溶液 + 0.5% 酢酸 + 0.1% ギ酸 (v/v)
有機移動相	メタノール + 0.5% 酢酸 + 0.1% ギ酸
カラム温度:	40 °C
サンプル温度:	15 °C
注入量:	5 µL
流速:	0.40 mL/分
ニードル:	FTN 15 µL
ニードル洗浄溶媒	水: メタノール: アセトニトリル: イソプロパノール : アセトン 20:20:20:20:20 + 1% ギ酸 (体積比)
シール洗浄溶媒:	水: アセトニトリル 80:20 (v/v)

UPLC グラジエント

時間 (分)	% 有機	% 水系	曲線
0	5	95	-
0.7	5	95	6
6.5	50	50	6
9.5	100	0	6
12.5	100	0	6
12.6	5	95	6
14	5	95	6

質量分析

システム:	Xevo TQ-S cronos
イオン化モード:	ESI+
測定モード:	マルチプルリアクションモニタリング (MRM)
キャピラリー電圧:	+0.75 kV
コーンガス流量:	50 L/時間
脱溶媒温度:	600 °C
脱溶媒ガス流量:	1100 L/時間

ソース温度: 150 °C

解決策: MS1 ユニット、MS2 ユニット

ソフトウェア: MassLynx v4.2 (データ解析にTargetLynx XS を使用)

最適化された MRM トランジション

分析種	予測 RT 範囲 (分) *	プリカーサーイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
アフラトキシン B ₁ (AFB ₁)	6.7~7.4	313.0	30	20
				37
アフラトキシン B ₂ (AFB ₂)	6.4~7.7	315.1	30	25
				28
アフラトキシン G ₁ (AFG ₁)	6.2~6.5	329.1	25	24
				20
アフラトキシン G ₂ (AFG ₂)	5.8~6.2	331.1	25	25
				30
オクラトキシン A (OTA)	8.5~8.9	404.1	20	25
				36

(*) 保持時間 (RT) は、変動する場合があります。試験注入を行って各 MRM チャンネルの取り込み時間を修正し、オーバーラップを最小限に抑えます。これにより、自動デュエルタイムが長くなります (ピーク幅 = 6 秒、ピークあたりのポイント数 = 15)。

デュエルタイム = 自動。

スパン = 0 Da (すべてのファンクションに対して)。

キャリブレーション標準試料の調製

各アフラトキシン (AFB₁、AFB₂、AFG₁ AFG₂ の混合物) が 1 µg/mL で、OTA が 10 µg/mL で含まれているアセトニト

リル標準溶液は Biopure (Romer Labs Division Holding GmbH) から購入しました。作業溶液は、250 μ L のアフラトキシンストック溶液と 100 μ L の OTA ストック溶液を混合し、シラン処理済みアンバー色ガラスバイアル中で合計容量 4 mL に調製しました。分析する前に、作業溶液の連続希釈液を LC バイアル中に直接調製しました。95:5 H₂O: MeCN (v/v) をすべての標準試料の希釈剤として使用しました。濃度範囲は、各アフラトキシンについて 0.013 ~ 5.0 ng/mL、OTA について 0.050 ~ 20 ng/mL でした。

代表的なクロマトグラム

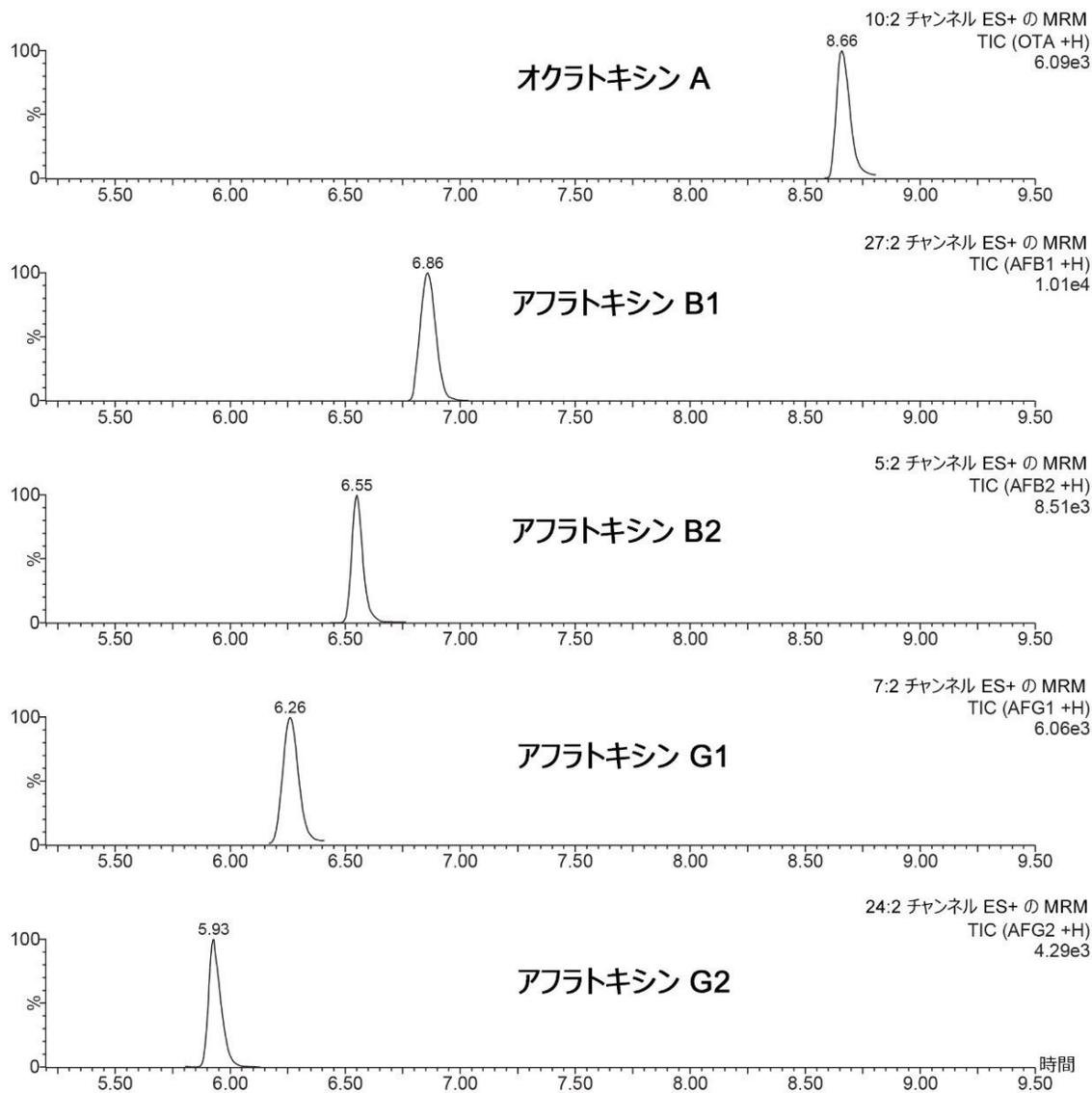


図 6. 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の各アフラトキシンおよび 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のオクラトキシン A を添加した、黒コショウのクリーンアップ済み抽出液のクロマトグラム

追加情報（ヒントとコツ）

- IAC 内の空気 - 保存用バッファー溶液の除去、ローディング、洗浄のどのステップの時点でも、IAC カートリッジを乾いた状態にしないでください。洗浄ステップが完了したら、カラムにゆっくりと空気を流して（約 3 mL）、カー

トリッジベッドを乾かします。溶出後、IAC カートリッジに空気をポンプで送り込み、残っている溶媒 (MeOH) をすべて収集して、最大限の回収を確保します。

- ろ過 - この文書に記載した分析法では、サンプル処理のどのステップでもろ過は行いませんでした。希釈した抽出物のろ過ステップが必要な場合は、フィルターの種類を慎重に選択する必要があります。以前の実験から (データは示されていません)、ガラス繊維シリンジフィルターおよび PTFE シリンジフィルターが最適の選択肢であることがわかりました。これらはアフラトキシンおよびオクラトキシン A の回収にほとんど影響を及ぼしません。一方、ポリフッ化ビニリデン (PVDF)、親水性ポリプロピレン (GHP)、ナイロンメンブレンは、回収に有害な影響をもたらすことがわかりました。
- 希釈 - 黒コショウの分析のためのサンプル前処理できわめて重要なステップは、IAC へのローディングステップの前に行う水系溶液による上清の希釈です。抗体は高濃度の有機溶媒の影響を受けやすいため、希釈は重要です。最初に、PBS を用いて上清を 1:4 に希釈しました。図 7 にこのステップの結果が示されています。

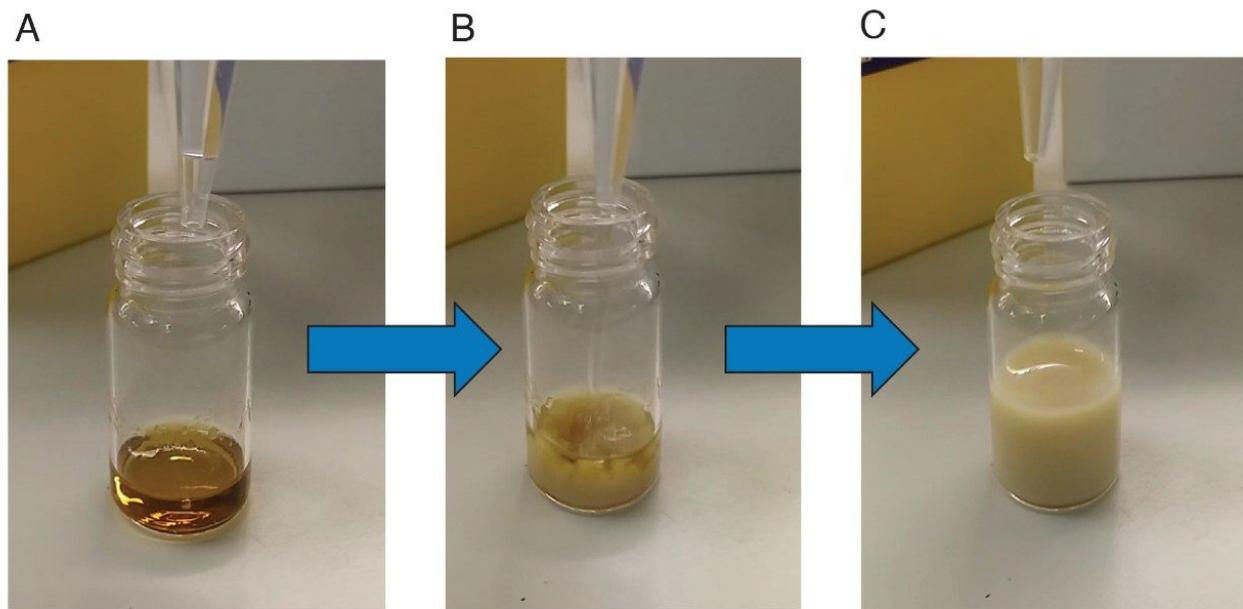


図 7. ガラス製バイアルに回収した上清 (A)。上清へ PBS を数滴追加 (B)。PBS によって上清を 1:4 (v/v) に希釈して得られた懸濁液 (C)。

希釈すると、溶液は濁った粘性的な懸濁液になり、外観は濃い色の沈殿になります。これは、80:20 有機：水系混合液によって共抽出されるオレオレジンの存在によるものです。オレオレジンや類似の脂溶性物質は、マイコトキシンなどの生理活性化合物を封入する場合があります、懸濁液が IAC を通る際の抗原-抗体相互作用の効率が低減されます。希釈した抽出物をろ過または遠心分離することは溶液の透明度を高めるのに役立ちますが、マイコトキシンの回収は改善されま

せん。ヘキサンまたは同等の非極性溶媒による上清の液-液分離に存在する脱脂ステップを取り入れると、希釈の前に脂溶性物質の濃度を低減できます。ただし、このステップによって問題は軽減されますが、解決には至りません。これは時間がかかり、最適ではないオプションです。

抽出物を界面活性剤溶液で 1: 20 (v/v) に希釈するのは効果的であることがわかりました。特に、2% (w/v) Tween-20 含有 PBS を使用して、マイコトキシンを溶液中に保持しました。界面活性剤によって液量が増えた状態でオレオレジン拡散させるためには、希釈係数を大きくすることも重要でした。図 8 に、PBS のみを使用した場合と PBS 中の Tween-20 を使用した場合の、希釈抽出液の比較が示されています。分析種に干渉して著しいマトリックス効果をもたらす可能性のあるさまざまな種類の共抽出化合物が存在することから、この戦略は、複雑なマトリックスとして知られているナツメグやその他のスパイスにも適用できます¹³。

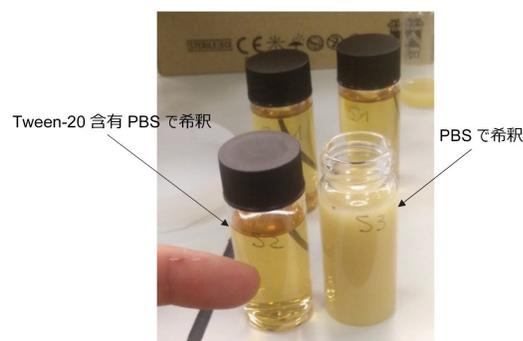


図 8. 希釈液に界面活性剤を添加した場合の希釈抽出物の比較

レファレンス物質の仕様

割り当て値は、さまざまな分析法を使用して適合性試験に参加しているラボの一致した意見から得られたものです。|z| ≤ 2 の範囲は、z スコア ±2 以内の濃度範囲です。

ヘーゼルナッツ（水/ナッツスラリー） - T04390QC

分析種	割り当て値 (Xa) [µg/kg]	z ≤ 2 の範囲 [µg/kg]	Xa を生成するデータポイントの数
アフラトキシン B ₁	4.5	2.52~6.49	54
アフラトキシン B ₂	2.27	1.27~3.26	51
アフラトキシン G ₁	1.96	1.10~2.83	51
アフラトキシン G ₂	1.09	0.61~1.57	51
オクラトキシン A	7.96	4.46~11.47	26

黒コショウ - T04332QC

分析種	割り当て値 (Xa) [µg/kg]	z ≤ 2 の範囲 [µg/kg]	Xa を生成するデータポイントの数
アフラトキシン B ₁	3.40	1.91~4.90	35
アフラトキシン B ₂	3.44	1.93~4.96	34
アフラトキシン G ₁	1.52	0.85~2.19	33
アフラトキシン G ₂	2.34	1.31~3.36	34
オクラトキシン A	8.87	4.97~12.78	27

リン酸バッファー（PBS）の組成

PBS は、抽出物を希釈して pH を 7.0 に安定化できるようにするために使用されます。VICAM の 10 倍濃縮の PBS（製品番号 G1113）は、1:10 に希釈して使用できるバッファー溶液です。または、10 倍濃縮の PBS は、以下のように調製できます。

精製水 990 mL に 8.0 g の NaCl、1.2 g の Na₂HPO₄、0.2 g の KH₂PO₄、0.2 g の KCl を溶解し、濃塩酸で pH 7.0 に調整します。精製水で 1 L にします。

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

[AflaTest WB SR+ イムノアフィニティーカラム <https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus>](https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus)

[OchraTest WB イムノアフィニティーカラム <https://www.vicam.com/products/ochratest-wb>](https://www.vicam.com/products/ochratest-wb)

[AflaOchra LC イムノアフィニティーカラム <https://www.vicam.com/products/aflaochra-lc>](https://www.vicam.com/products/aflaochra-lc)

720007298JA、2021 年 6 月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー](#)
[環境設定](#)